

[文章编号] 1007-3949(2006)14-04-0321-04

• 实验研究 •

人激肽释放酶腺相关病毒载体的构建及其在人脐静脉内皮细胞中的表达

阮景明¹, 朱鹏立¹, 俞兆希¹, 陈 慧², 李体远³

(福建省立医院 1. 二内科; 2. 心内科, 福建省福州市 350001; 3. 深圳市人民医院, 深圳市 518100)

[关键词] 分子生物学; 腺相关病毒; 激肽释放酶; 共转染; 基因治疗; 高血压; 脐静脉内皮细胞

[摘要] 目的 研究人激肽释放酶腺相关病毒载体的构建, 观察重组病毒感染人脐静脉内皮细胞株后人激肽释放酶基因的表达。方法 将人激肽释放酶基因定向克隆入 AAV 载体质粒 pAAV-MCS 中, 并与两种辅助质粒 pAAV-RC 和 pHelper 共转染 293 细胞, 包装成带有人激肽释放酶基因的重组腺相关病毒(rAAV); 收集病毒颗粒并测定病毒滴度。以不同滴度的病毒分别感染人脐静脉内皮细胞, 逆转录聚合酶链反应定量检测人激肽释放酶在该细胞中的表达。酶联免疫吸附法测定人脐静脉内皮细胞内人激肽释放酶的含量。结果 成功获得了重组人激肽释放酶基因 AAV 载体, 重组病毒滴度为 6.2×10^{10} 个/L。以滴度分别为 1×10^9 个/L、 1×10^8 个/L 和 1×10^7 个/L 的病毒感染人脐静脉内皮细胞, 与空白对照组比较, 人激肽释放酶的表达均有增加 ($P < 0.05$), 但以 1×10^9 个/L 组升高最明显 ($P < 0.001$)。结论 带有人激肽释放酶的重组腺相关病毒滴度可以稳定地达到 10^{10} 个/L 以上, 感染人脐静脉内皮细胞后, 人激肽释放酶基因在宿主细胞中的表达明显增强。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

Construction of Recombinant Adeno-Associated Virus Vector and Expressing Human Tissue Kallikrein Gene and Its Delivery in Human Umbilical Vein Endothelial Cell

RUAN Jing-Ming¹, ZHU Peng-Li¹, YU Zhao-Xi¹, CHEN Hui², and LI Ti-Yuan³

(1. Second Department of Internal Medicine, 2. Department of Cardiology, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, 3. Clinical Medicine Research Center, Shenzhen Hospital, Shenzhen 518100, China)

[KEY WORDS] Adeno-Associated Virus; Kallikrein; Co-Transfect; Gene Therapy; Hypertension; Human Umbilical Vein Endothelial Cell

[ABSTRACT] **Aim** To construct the recombinant adeno-associated virus vector (rAAV) expressing the human tissue kallikrein (HK) gene and detect the expression of interested gene in human umbilical vein endothelial cell (hUVEC) which were infected with different titer of rAAV. The feasibility of gene therapy for hypertension by rAAV mediated human tissue kallikrein gene transfection was discussed. **Methods** The HK gene was directionally cloned into the pAAV-MCS, and cotransfected AAV-293 cell with other two plasmids (the pAAV-RC, and pHelper) by lipofectamine. The recombinant AAV particles were harvested and the viral titer was measured. Then hUVEC were infected with different titer of rAAV particles. 72 hours later, the expression of human tissue kallikrein gene was detected by RT-PCR and ELISA. **Results** The AAV expressing system of human tissue kallikrein gene was successfully constructed with a titer of 6.2×10^{10} particles/L measured with In Situ β -Galactosidase Staining Kit. Compared with control group, the expression of HK gene in groups infected with rAAV at different titer of 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 increased significantly ($P < 0.05$), especially in the group of 1×10^9 ($P < 0.001$). **Conclusions** When cotransfecting AAV-293 cell with three plasmids (the recombinant pAAV expression plasmid, pAAV-RC, and pHelper), the titer of rAAV particles can reach $> 10^{10}$ particle/L stably. The interested gene can be expressed significantly and stably when using recombinant AAV viral to infect the cultured mammal cell.

人激肽释放酶(human kallikrein, HK)是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 由血管内皮细胞和血管平滑肌细胞生成, 能够剪切低分子量激肽原生成具有血管活性的缓激肽^[1,2]。研究表明, 原发性高血压患者尿

液中的激肽释放酶明显降低^[3]。导入外源性激肽释放酶对心肌缺血再灌注损伤组织有保护作用^[4], 国外研究表明, 用腺病毒介导的 HK 基因从尾静脉注入高血压大鼠, 可观察到血压下降, 左心室厚度明显缩小, 并抑制心肌增生, 同时伴有肾血流量、尿量和肾小球滤过率的增加^[5]。国内赵春霞等^[6]报道过以 HK 基因为效应分子来进行降压治疗的动物实验。但是有关以腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)为载体转染 HK 基因研究的报道甚少。本文对重组

[收稿日期] 2005-04-21

[修回日期] 2006-03-20

[作者简介] 阮景明, 硕士, 主治医师, 研究方向为心血管病基因治疗, 联系电话为 13705030702, E-mail 为 fareast1973@hotmail.com。通讯作者朱鹏立, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管病治疗, 联系电话为 13328267755, E-mail 为 zpl7755@126.com。

病毒感染人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, hUVEC)时 HK 基因的表达进行了研究。

1 材料和方法

1.1 试剂和主要设备

腺相关病毒(AAV) Helper Free System(STRTA-GENE 公司 Catalog # 240071); β 半乳糖苷酶原位染色试剂盒(STRTAGENE 公司 Catalog # 200384)、XL10-Gold 超级感受态细菌(STRTAGENE 公司 Catalog # 200314); AAV-293 细胞株(STRTAGENE 公司 Catalog # 240073); 人纤维肉瘤细胞 HT1080(ATCC, Catalog # CCL-121); 原代人脐静脉内皮细胞(Cascade 生物公司 Catalog # C-003-5C); 胰酶和 EDTA (Sigma 公司); 热灭活的胎牛血清, DMEM 培养基(Gibeco 公司); Xba I, EcoR I, Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity, T4 DNA Ligase, LIPOFECTAMINE2000 (INVITROGEN 公司); 小量质粒抽提试剂盒, 胶回收试剂盒, PCR 产物纯化试剂盒(上海华舜); 大量质粒抽提纯化试剂盒(QIAGEN 公司)。兔抗人 HUK-IgG 多克隆抗体(1: 5 000, CALBIOCHEM 公司); 鼠抗 HUK-Fab 单克隆抗体(1: 2 000, USBIOLOGY 公司); HRP 标记的羊抗鼠-IgG 抗体(1: 200, CALBIOCHEM 公司); DAB 显色液(华美生物公司); 人尿激肽释放酶标准品(Unicorn Diagnostics); 550 酶标仪(BIO-RAD 公司); 96 孔酶标板(晶美生物公司), DU-640 紫外分光光度计(Beckman 公司)。

1.2 目的基因的克隆与质粒的纯化

人激肽释放酶(HK) 基因全长 789 bp, 连接于 pBluescript \oplus KS 质粒中, 由杜珙等^[7]克隆完成并提供。设计引物并在两端加入 Xba I 和 EcoR I 酶切位点扩增出目的基因, 引物序列如下: 正向 5'-CGG AAT TCA TGT GGT TCC TGG TTC TGT G-3', 反向 5'-GCT CTA GAT CAG GAG TTC TCC GCT ATG G-3'。反应条件: 94℃ 2 min \rightarrow 94℃ 30 s \rightarrow 55℃ 30 s \rightarrow 72℃ 60 s, 72℃ 7 min, 用 Xba I 和 EcoR I 分别酶切 pAAV-MCS 质粒和聚合酶链反应产物, 得到 pAAV-MCS 和 HK 的线性片段。T4 DNA 连接酶 4℃ 连接 16 h。将连接产物转化 XL10-Gold 超级感受态细菌(转化操作按 XL10-Gold 超级感受态细菌说明完成), 挑选阳性菌落抽提质粒, 做 PCR 鉴定及测序鉴定。PCR 鉴定引物如下: 正向 5'-ATT CTG AGT CCA AGC TAG GC-3', 反向 5'-TAG AAG GAC ACC TAG TCA GA-3'。反应条件: 94℃ 2 min \rightarrow 94℃ 30 s \rightarrow 55℃ 30 s \rightarrow 72℃

2 min, 72℃ 7 min。大量抽提并纯化转染所需的 4 种质粒: 重组质粒(pAAV-HK)、pAAV-LacZ、pAAV-RC 和 pHelper, 并测量其浓度。

1.3 腺相关病毒转染条件

包装病毒前, 将 AAV293 细胞按 2×10^4 个/mm² 密度接种于 12 孔培养板中, 共接种 5 孔。在 DMEM 生长培养基(含 10% 胎牛血清)中培养 48 h。以 pAAV-lacZ 作为报告基因和 pHelper、pAAV-RC 共转染 AAV293 细胞, 操作按试剂盒说明进行。原位染色, 细胞着色最多组的 DNA 和脂质体之比即为最佳的转染条件。实际操作中各孔 DNA 和脂质体的比例分别为 1: 4、2: 4、3: 4、6: 4、6: 6 和 6: 8(g: L), 其中 3 种质粒均等量分配。

1.4 腺相关病毒滴度的测定

以最佳的转染条件用 pAAV-lacZ、pHelper 和 pAAV-RC 共转染 AAV293 细胞, 收集病毒原液并将其用 DMEM(含 2% 胎牛血清)以 $10 \times$ 浓度梯度稀释成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 各 2 mL 备用。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 将 HT1080 细胞以 1.5×10^5 的密度接种于 12 孔培养板中, 加入羟基脲使细胞的生长期趋于一致, 加入丁酸钠促进外源基因的表达。细胞接近 70% 汇合时加入稀释好的病毒悬液, 每种浓度各加 3 孔。孵育 48 h 后用 X-Gal 对细胞进行原位染色, 观察蓝染的细胞数, 计算病毒滴度。

1.5 激肽释放酶基因在脐静脉内皮细胞中的表达

传代培养 hUVEC, 相差显微镜观察及 VWF 相关抗原间接免疫荧光检查鉴定。以 DNA 总量: 脂质体 6: 6 的比例用 pAAV-HK、pHelper 和 pAAV-RC 3 种质粒共转染 AAV293 细胞。收集病毒原液, 将其用无血清 DMEM 稀释为 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 和 1×10^6 个/L 各 2 mL 备用。按病毒滴度将实验分为 1×10^9 组、 1×10^8 组、 1×10^7 组、 1×10^6 组以及空白组, 每组各重复 8 次。用含 10% 胎牛血清 DMEM 将 hUVEC 以 1×10^6 的密度接种于 6 孔培养板中, 每板种 5 孔, 每孔对应一组。细胞接近 70% 汇合时, 吸去培养基。各加入稀释好的病毒悬液 2 mL, 并立即将其和细胞混匀。对照组仅加入无血清的 DMEM 液 2 mL。将培养板转到 37℃ 5% CO₂ 恒温箱中孵育 1 h 后, 取出培养板, 调整血清浓度均为 10%, 再将培养板置于 37℃ 5% CO₂ 恒温箱中培养 72 h, 抽提 RNA, 半定量 RT-PCR 检测 HK 基因在 hUVEC 细胞中的表达。引物序列如下: 正向 5'-GAG TGT GAG CAG CAT TCC CAG-3', 反向 5'-TCT GTC ACC TTC TGG ACG TGG-3'。同时以 β -actin 为内参照引物, 引物的序列如下: 正向 5'-TGT GCT ATC C CT GTA CGC

CTC-3', 反向 5'-AAT GTC ACG CAC GAT TTC CG-3'。经平台期测试对循环次数优化, 选取 28 个循环为最佳次数, 各以 1 μ g 总 RNA 为模板, 定量逆转录聚合酶链反应检测激肽释放酶基因的表达。反应条件: 55 $^{\circ}$ C 30 min \rightarrow 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 15 s \rightarrow 52 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 7 min, 4 $^{\circ}$ C。取 6 μ L PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果经凝胶成像分析系统进行图像分析, 光密度值经内参照 β -actin 校正。

1.6 双抗夹心法测组织激肽释放酶浓度

实验分为空白组、LacZ 组和 HK 组。在 6 孔组织培养板中每孔以 1.5×10^5 的密度加入 hUVEC, 每孔加 2 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 共接种 6 块板。37 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 细胞密度达到 50% 时备用。空白组仅加无血清 DMEM 培养基 2 mL, LacZ 组加入 1×10^9 个/L rAAV-LacZ 病毒液 2 mL, HK 组加入 1×10^9 个/L rAAV-HK 病毒液 2 mL, 每组加 2 孔。置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 培养 3 h, 每隔 30 min 轻轻漩涡振荡培养板几次。吸除 6 孔培养板中的病毒液以及 DMEM 储存液, 并用 2 mL PBS 洗涤 3 次, 每孔加入 2 mL 含 5% FBS 的 DMEM 培养基, 置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 孵育 48 h, 每天观察直至细胞长满, 提取总蛋白测定各管样品中总蛋白浓度, 并用 PBS 调整各管细胞溶解液的总蛋白浓度为 0.2 g/L。酶联免疫吸附测定法按试剂盒说明完成。测 490 nm 波长的吸光度值。根据标准曲线计算样品中 HK 浓度。

1.7 统计学处理

采用 SPSS11.0 软件分析。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性; $P < 0.01$ 表示差异有非常显著性。

2 结果

2.1 目的基因的克隆与质粒的纯化

克隆成功的质粒 PCR 产物比空白质粒 PCR 产物约大 800 bp (图 1)。测序报告经 BLAST 提交证实与人 HK-cDNA 序列完全相同。

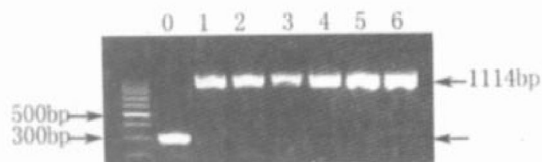


图 1. 重组质粒的聚合酶链反应鉴定 0 为空白质粒 PCR 产物, 1~6 为重组质粒 PCR 产物 (引物位于质粒多克隆位点两端, 上下游相距 329 bp, 目的基因插入多克隆位点中间, 长度 785 bp)。

2.2 腺相关病毒转染条件

以 pAAV-lacZ、pHelper 和 pAAV-RC 共转染 AAV293 细胞, 经 X-Gal 原位染色后可见包装有腺相关病毒颗粒的 293 细胞呈现蓝绿色, 细胞边界清晰可见。12 孔板中当脂质体和质粒总量比值为 6 L: 6 g 时, 着色细胞最多, 转染效率最高, 即为最佳转染条件 (图 2)。



图 2. 以 pAAV-lacZ、pHelper 和 pAAV-RC 共转染后 293 细胞原位染色图片 (200 \times)

2.3 腺相关病毒滴度的测定结果

收集病毒原液以不同的稀释倍数感染 HT1080 细胞, 48 h 后同样用 X-Gal 原位染色观察, 发现当病毒原液以 10^{-4} 稀释时对 HT1080 细胞的感染率最高, 但基因的表达较原代时较弱, 表现为细胞着色较浅, 而且边界着色亦不明显。计数着色细胞数换算成病毒滴度为 6.2×10^{10} 个/L, 对 HT1080 细胞的感染率约为 20% (图 3)。

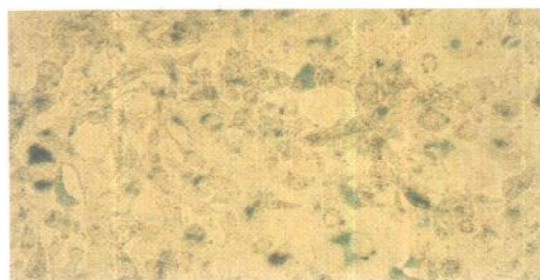


图 3. 10 000 倍稀释后的病毒原液感染 HT1080 细胞染色后图片 (400 \times)

2.4 激肽释放酶基因在脐静脉内皮细胞中的表达

荧光抗体法证明胞质中有 VWF 因子, 证实为血管内皮细胞。通过腺相关病毒向体外培养的 hU-VEC 中导入 HK 基因 48 h 后, 与空白对照组比较,

hUVEC 激肽释放酶 mRNA 表达均有不同程度上升 ($P < 0.05$), 其中病毒滴度 1×10^9 个/L 时, 细胞激肽释放酶 mRNA 表达升高最明显 ($P < 0.001$) (图 4)。空白组、Lac Z 组和 HK 组细胞内 HK 蛋白表达分别为 31 ± 13 、 33 ± 11 和 120 ± 41 ($P < 0.01$)。

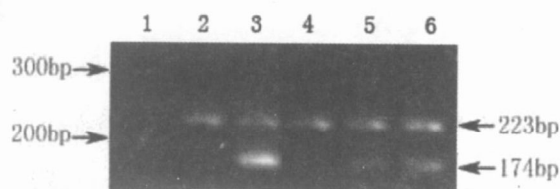


图 4. 逆转录聚合酶链反应测定人脐静脉内皮细胞中人激肽释放酶基因转录 1 为 DNA Ladder, 2 为 10 000 倍稀释病毒干预组, 3 为 10 倍稀释病毒干预组, 4 为空白组, 5 为 1 000 倍稀释病毒干预组, 6 为 100 倍稀释病毒干预组。

3 讨论

腺相关病毒(AAV)具有高度生物安全性,它在辅助病毒(腺病毒或是单纯疱疹病毒)存在下能够复制,AAV 可以感染许多哺乳动物细胞而不论其是否处于分裂期,表达出人类或非人类蛋白,AAV 整合到宿主基因组后可以较长期地表达目的基因。作为基因治疗的有效载体,腺相关病毒的安全性已被公认,但不足之处是病毒的构建较复杂,而且很难达到体外治疗所需的较高滴度。本研究用三质粒共转染 293 细胞成功构建了携带 HK 基因的重组 AAV-2 载体,该方法和其他腺相关病毒表达系统比较具有以下优点: ①重组病毒的产生不依赖于辅助病毒(如腺病毒或疱疹病毒)的存在,从而避免了后者引起免疫排斥的可能;②可以通过共转染报告基因 LacZ 观察报告基因的表达,摸索最佳转染条件;③病毒滴度的测定方法更简单直观。与通常的点杂交法不同,我们用 LacZ 作为报告基因,在同样的条件下共转染 293 细胞,收集重组 LacZ 基因的 AAV,并以该重组 AAV 感染 HT1080 细胞,经 β 半乳糖苷酶原位染色,通过蓝染的细胞数换算成病毒滴度。直接计算目的基因的表达,从而消除了病毒空泡所引起的假性滴度。

不同浓度重组病毒导入体外培养的 hUVEC 后,用半定量逆转录聚合酶链反应法证实了腺相关病毒携带的 HK 基因在体外培养的 hUVEC 中得到有效表达,尤其是当滴度为 1×10^9 /L 时,激肽释放酶 mRNA 表达水平最高,但目的基因表达与所加病毒量并没有表现出线性相关,与文献[8]报道一致。其确切

原因尚不清楚,可能与细胞表面和 AAV 结合的特异性受体数目差异有关。AAV 对不同宿主细胞的感染效率不同,例如对肺上皮细胞感染能力低,但对神经元、肌细胞、造血干细胞及其他非分裂细胞有较高的感染率。最近研究表明 AAV 易感的宿主细胞表面存在 AAV-2 的细胞膜受体、硫酸肝素蛋白多糖和另外两个受体、成纤维细胞生长因子受体(FGFR-1)和整合素 $\alpha V\beta 5$ 。细胞表面这些受体的丰度决定着基因转导的效率^[9]。但受体和 AAV 相互作用关系以及受体之间有无拮抗均有待研究。

用 HK 基因作为效应分子用于高血压的治疗国外已经取得了一定的进展,Costanza 等^[10]发现,在后肢缺血的自发性高血压大鼠模型中局部肌肉注射腺病毒介导的 HK 基因能显著增强肌肉毛细血管的生成并促进双下肢血流动力学的恢复,但是质粒注射引起的降压效应只能是瞬时表达。本研究证实 rAAV-HK 感染 hUVEC 后胞内 HK 的含量升高明显,与文献[6]结果一致。相近的实验还证实导入该重组病毒后,培养的 hUVEC 胞内 NO 一氧化氮合成也有明显的上升^[11]。这些结果都预示了重组 HK 的腺相关病毒在高血压及冠心病基因治疗上的良好前景,但是其长期的表达以及对整体动物的影响仍有待进一步观察。

[参考文献]

- [1] Clements JA. The glandular kallikrein family of enzyme: tissue specific expression and hormonal regulation[J]. *Endocrine Rev*, 1989, **10**: 393-410
- [2] Scicli AG, Carretero OA. Renal kallikrein-kinin system[J]. *Kidney Int*, 1986, **29**: 120-130
- [3] Shimamoto K, Ura N, Tanaka S. Excretion of human urinary kallikrein quantity measured by a direct radioimmunoassay of human urinary kallikrein in patients with essential hypertension and secondary hypertensive disease[J]. *Jpn Circ J*, 1981, **45**: 1 092-097
- [4] 杨立华, 姜志胜, 欧和生. 人尿激肽释放酶对兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6** (1): 53-55
- [5] Katsutoshi Y, Wang C. Kallikrein gene delivery attenuates hypertension and cardiac hypertrophy and enhances renal function in goldblatt hypertensive rats[J]. *Hypertension*, 1998, **31**: 1 104-110
- [6] 赵春霞, 汪培华, 李宏伟. 人组织型激肽释放酶基因降低果糖诱导高血压大鼠的血压并改善高胰岛素血症[J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2002, **8** (2): 3-7
- [7] 杜琪, 李体远, 黄瑞芳. 人组织激肽释放酶基因的克隆及表达载体的构建[J]. *实用医学杂志*, 2002, **11** (6): 21-23
- [8] 高雪军, 伍志坚. 腺相关病毒载体介导的人内皮抑素的体外表达及对内皮细胞抑制作用的研究[J]. *病毒学报*, 2002, **18** (3): 47-51
- [9] Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a coreceptor for infection by adenovirus 2[J]. *Nat Med*, 1999, **5**: 71-77
- [10] Costanza E, Maria BS. Rescue of impaired angiogenesis in spontaneously hypertensive rats by intramuscular human tissue kallikrein gene transfer[J]. *Hypertension*, 2001, **38**: 136-141
- [11] 陈慧, 朱鹏立, 李体远. 重组人组织激肽释放酶基因转染人脐静脉内皮细胞[J]. *高血压杂志*, 2004, **5** (18): 75-79

(此文编辑 朱雯霞)